

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 944**

51 Int. Cl.:

**G21K 1/00** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2004 E 04731667 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 1620862**

54 Título: **Fraccionamiento de partículas**

30 Prioridad:

**08.05.2003 GB 0310497**

**19.06.2003 GB 0314269**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**07.09.2015**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY  
OF ST. ANDREWS (100.0%)  
College Gate, North Street  
St. Andrews, Fife KY16 9AJ, GB**

72 Inventor/es:

**MACDONALD, MICHAEL PETER;  
DHOLAKIA, KISHAN;  
NEALE, STEVEN LEONARD y  
SPALDING, GABRIEL COOPER**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 544 944 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Fraccionamiento de partículas

- 5 La presente invención se refiere a un sistema y método para la separación o fraccionamiento de partículas de acuerdo con uno o más criterios físicos. El mismo sistema puede usarse para insertar partículas en otra corriente de flujo (una forma de mezclado).
- 10 Existen varias estrategias de fraccionamiento, que varían desde la electroforesis en gel, electroforesis capilar y centrifugación analítica a novedosas barreras entrópicas. Ejemplos de estos se describen por J. Han, H. G. Craighead, *Science* 288, 1026-1029 (12 de mayo de 2000) y D. Nykypanchuk, H. H. Strey, D. A. Hoagland, *Science* 297, 987-990 (9 agosto de 2002). La mayoría de estas técnicas conocidas separan una mezcla polidispersa en bandas que contienen partículas que viajan a diferentes velocidades a lo largo de la dirección del flujo. Esto conduce normalmente a un procesamiento por lotes. En electroforesis, se puede usar un gel para obtener una movilidad dependiente del tamaño. La recuperación de fracciones se consigue por medio de un procesamiento posterior del gel. Sin embargo, a pesar de su uso ampliamente extendido y efectividad, esta metodología es lenta y más importante, debido a los tamaños de poro limitados, tiene dificultad en la separación de objetos a nivel de tamaño microscópico, por ejemplo células, cromosomas, y materia coloidal.
- 15
- 20 Se usan también geles artificiales bidimensionales, asimétricos fabricados de modo litográfico. Ejemplos de éstos se describen en los artículos de D. Ertas, *Physical Review Letters* 80, 1548-1551 (16 de febrero de 1998); T. A. J. Duke, R. H. Austin, *Physical Review Letters* 80, 1552-1555 (16 de febrero de 1998) y C. F. Chou et ál., *Biophysical Journal* 83, 2170-2179 (octubre de 2002). Estos geles conducen a una separación transversal a la dirección del flujo. Debido a ello, se pueden operar en una forma continua, tomándose varias fracciones por canales de recogida separados.
- 25 Sin embargo, la clasificación basada en la difusión se convierte en irrealizablemente lenta a escala microscópica y superior.
- Otra estrategia de fraccionamiento que se ha propuesto se describe en el artículo "Kinetically Locked-in Colloidal Transport in an Array of Optical Tweezers" por Korda et ál., *Physical Review Letters*, Vol. 89, Número 12, 16 de
- 30 septiembre de 2002. En este caso, se permite que una monocapa de esferas coloidales fluya a través de una matriz de trampas ópticas discretas. Al variar la orientación del entramado de trampas se ha demostrado que la dirección del flujo de las esferas podría variarse. Debido a ello, se ha sugerido que el entramado se podría usar para fraccionar continuamente partículas mesoscópicas. Sin embargo, debido al uso de un entramado de trampas discretas localizadas, la canalización bloqueada cinéticamente observada a lo largo de vectores del entramado de
- 35 bajo índice se limitó de modo intrínseco a deflexiones de pequeño ángulo. En la práctica, esto limita la utilidad del entramado para su uso en el fraccionamiento.
- Los sistemas de fraccionamiento se usan en muchas aplicaciones diferentes. Un campo en donde su uso está tomando un creciente interés es el de los microfluidos. En microfluidos, el flujo es predominantemente laminar, creando retos en el diseño de actuadores tales como mezcladores y clasificadores. La capacidad para seleccionar y clasificar tanto material coloidal como biológico en una forma relacionada con sus propiedades físicas de un modo rápido y eficiente es un requisito clave en este nivel.
- 40
- Un objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema y método mejorados para la separación o fraccionamiento de partículas
- 45
- Se definen varios aspectos de la invención en las reivindicaciones independientes. Algunas características preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes.
- 50 Los pocillos de potencial se enlazan de tal manera que el entramado es asimétrico. Con ello se quiere indicar que el entramado tiene una conectividad más fuerte a lo largo de una dirección que a lo largo de otra dirección. Esto permite la deflexión en una única dirección, lo que es un requisito clave para una deflexión útil.
- Los pocillos en una dirección del entramado pueden estar fuertemente enlazados y los pocillos en otra dirección pueden estar sustancialmente sin enlazar. Por fuertemente enlazado se quiere indicar que el patrón de intensidad de luz en dicha una dirección de entramado tiene picos y depresiones, en los que la intensidad en una depresión no cae por debajo de aproximadamente un tercio de la intensidad en un pico.
- 55
- Alternativamente, los pocillos en una dirección del entramado pueden estar completamente enlazados y los pocillos en otra dirección pueden estar sustancialmente sin enlazar. Por completamente enlazados se quiere indicar que no hay sustancialmente depresiones en el patrón de intensidad en la dicha una dirección de entramado. Una ventaja de esto es que puede evitarse el problema de atasco debido a la localización de partículas en los máximos de intensidad.
- 60
- Los pocillos se pueden enlazar para hacer posible una deflexión en un intervalo de 0 grados a 85 grados. El ángulo de deflexión puede ser de 45 grados o más.
- 65

Se describirán a continuación varios aspectos de la presente invención solamente a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 5 La Figura 1 es un diagrama de bloques del sistema para el fraccionamiento de partículas usando un entramado óptico;
- la Figura 2 es un diagrama esquemático de un sistema para la definición de un entramado óptico en el sistema de la Figura 1;
- la Figura 3(a) es un mapa de intensidad en falso color y dos escaneados de un entramado óptico en la que se definen trampas discretas;
- 10 la Figura 3(b) es un mapa de intensidad en falso color y dos escaneados para un entramado óptico en el que se definen trampas débilmente enlazadas;
- la Figura 3(c) es un mapa de intensidad en falso color y dos escaneados para un entramado óptico en el que se definen guías extendidas;
- 15 la Figura 4(a) es una vista de una mezcla sílice/polímero;
- la Figura 4(b) es una vista de las trayectorias trazadas por las partículas de la mezcla de la Figura 4(a) cuando se mueven a través de un entramado óptico tridimensional;
- la Figura 4(c) es una vista separada de la trayectoria para el polímero;
- la Figura 4(d) es una vista separada de la trayectoria para el sílice;
- 20 la Figura 5 es un trazado que muestra resultados experimentales para diferentes tipos de entramado;
- la Figura 6 es una vista de las trayectorias trazadas por las partículas de otra mezcla polidispersa cuando se mueven a través de un entramado óptico tridimensional;
- la Figura 7 es un diagrama que ilustra una clasificación con marcado, y
- la Figura 8 es una vista que muestra la separación de un único eritrocito a partir de un flujo de linfocitos.

25 La Figura 1 muestra un sistema micro-fluídico para fraccionamiento de partículas. Éste tiene una cámara de fraccionamiento 2 y medios (no mostrados) para la definición de un entramado óptico dentro de esa cámara 2. Conectado a la cámara de fraccionamiento 2 mediante unos pasos para fluido adecuados hay cuatro cámaras A, B, C y D. El fluido puede fluir entre la cámara A y las cámaras C y D a través de la cámara de fraccionamiento. De la misma forma, el fluido puede fluir entre la cámara B y las cámaras C y D a través de la cámara de fraccionamiento 2.

30 Incluido en la cámara B hay un fluido poli-disperso que incluye dos tipos de partículas diferentes. La cámara A introduciría normalmente una corriente de flujo "en blanco", aunque ésta podría ser cualquier corriente dentro la que se han de introducir las partículas seleccionadas.

El entramado óptico se crea usando un patrón de interferencias multi-haz que forma un panorama de energía potencial en 3D personalizado, que provoca que se desvíen micro-objetos en una forma deseada. Preferiblemente, el entramado óptico es tridimensional por naturaleza admitiendo la capacidad de clasificar partículas a todo lo largo de un flujo tridimensional. La interacción entre el entramado óptico y la materia provoca que tipos de partículas seleccionados sigan recorridos descritos a través del entramado, proporcionando de ese modo un fraccionamiento óptico. En el ejemplo mostrado en la Figura 1, el entramado óptico se adapta para dirigir un conjunto de las partículas que se originan desde la cámara B al interior de la cámara C y las otras partículas al interior de la cámara D. En este caso un conjunto de partículas se desvía mediante el entramado óptico, mientras que el otro conjunto queda en su gran mayoría sin afectar. Se debería tomar nota de que el entramado óptico, que es un patrón de luz modulado, no está limitado a las longitudes de onda visibles de la luz.

45 Son conocidas las disposiciones para la definición de entramados ópticos, y se han usado para otras aplicaciones. Se muestra en la Figura 2 un ejemplo específico de una disposición adecuada. Ésta tiene un divisor de haces 10 óptico difractivo (DOE) que divide un haz láser en cuatro haces 12 de primer orden más los haces de orden cero restantes 14 en el centro de una forma de cruz. Se proporciona una abertura para eliminar los haces de mayor orden. La luz procedente del DOE 10 se dirige al interior de una primera lente 16. Ésta se sitúa de modo que su salida comprende cinco haces paralelos, esto es los cuatro haces 12 de primer orden y el único haz 14 de orden cero. En el recorrido óptico de los haces de primer orden se proporcionan filtros 18 de densidad neutra. Esto reduce la intensidad de los haces de primer orden de modo que pueda obtenerse el enlace más fuerte entre los máximos de intensidad del patrón de interferencia multi-haz. Como un ejemplo específico los filtros de densidad neutra 18 pueden tener cada uno una potencia de 0,3D.

55 Aguas abajo desde los filtros de densidad neutra 18 hay láminas cubreobjetos 20 que se podrán usar para cambiar la longitud del recorrido efectivo de un haz sin introducir una deflexión significativa. En el recorrido óptico desde los cubreobjetos 20 hay un espejo 22 que gira la luz en aproximadamente noventa grados sobre otra lente 24, que enfoca la luz hacia otro espejo 26. La luz reflejada desde el espejo 26 se dirige hacia otra lente 28, que se sitúa de modo que proporcione una entrada que tenga cuatro haces de primer orden paralelos y un haz de orden cero a una disposición de pinzas ópticas 30. La disposición de pinzas ópticas está adaptada en general para mantener partículas dentro de pocillos de potencial. Sin embargo, para las finalidades de la presente invención, no es deseable la captura de partículas. Por ello, aunque pueda usarse una disposición de pinzas ópticas 30 para definir un entramado de lugares discretos, aquí se adapta de modo que las fuerzas de gradiente óptico y/o la presión de radiación pueda ser efectiva para desviar las partículas que se mueven a través de un entramado extendido. No hay necesidad de pinzamiento óptico per se, es decir no hay necesidad de retener partículas dentro de los pocillos

5 ópticos. Por ello, el entramado que se usa no es una matriz de pinzas ópticas. Usando la disposición de la Figura 2, es posible generar un entramado óptico en 3D, en particular un entramado tetragonal centrado en el cuerpo, usando un patrón de interferencia de cinco haces. Cuando se pasa un flujo de partículas mezcladas a través del entramado, partículas seleccionadas son fuertemente desviadas de sus trayectorias originales mientras que otras pasan rectas en su gran mayoría sin obstáculos, dependiendo crucialmente de su sensibilidad a la potencia óptica.

10 El sistema de fraccionamiento de la Figura 1 se basa en el hecho de que una partícula se pueda desviar cuando se mueve dentro de un entramado óptico, debido a la variación espacial del campo de radiación. La reducción de energía,  $U$ , que tiene lugar cuando una partícula dieléctrica se asienta en un punto particular en el entramado óptico, (en oposición a un punto alejado fuera del haz láser) se puede hallar mediante la integración del producto de la capacidad de polarización relativa y la densidad de energía local,  $\eta$ , a través del volumen  $V$  de la partícula:

$$U = \frac{\epsilon - \epsilon_0}{\epsilon_0} \int \eta dV \quad (1)$$

15 Debería tomarse nota de que ésta no tiene en cuenta todos los factores de complicación presentes, principalmente la presión de radiación. Sin embargo, sirve como una guía razonable en un amplio intervalo de tamaños de partículas, permitiendo un conocimiento de los diversos regímenes de flujo disponibles para este sistema, así como la identificación de los parámetros de control principales.

20 A partir de la Ecuación (1), se puede ver que el potencial de captura local es una función de la capacidad de polarización del material de partículas en comparación con el del medio que lo rodea, la intensidad local del entramado y tamaño de partículas. Para partículas pequeñas, hasta la escala de los máximos de intensidad de un lugar de entramado dado en el entramado óptico, la interacción crece según la tercera potencia del radio permitiendo el fraccionamiento de partículas por tamaño. Para partículas mayores, la intensidad de la interacción depende de la relación específica del tamaño de partícula a los parámetros del entramado óptico. Alternativamente, los parámetros de entramado se pueden ajustar para eliminar cualquier dependencia del tamaño (a través de algún intervalo de tamaño de partículas), permitiendo de ese modo la selección basada puramente en el índice de refracción. Esta clase de criterio de selección ajustable es una característica clave del método. Para su guiado es importante considerar la diferencia de potencial entre sitios de entramados adyacentes, es decir  $\Delta U$ , cuando la partícula se mueve a través del entramado óptico desde un máximo a un mínimo en la intensidad de luz. Cuanto mayor sea el potencial de captura mayor será la fuerza ejercida sobre una partícula. Sin embargo, el fluido que fluye a través del entramado óptico ejerce un rozamiento de Stokes sobre las partículas dentro de ese flujo que actúa en la dirección del flujo. El rozamiento de Stokes ejerce una fuerza sobre la partícula dada simplemente por la ley de Stokes (para partículas esféricas), igual a la fuerza requerida para mantener una partícula contra el flujo:

$$F = 6 \pi \eta r v \quad (2)$$

40 En la que  $\eta$  es la viscosidad del fluido que contiene las partículas,  $r$  es el radio de la partícula y  $v$  es la velocidad del flujo de fluido. Si las fuerzas ejercidas sobre una partícula mediante una intensidad máxima en el entramado (fuerzas ópticas, particularmente la fuerza de gradiente) son mayores que la fuerza de Stokes, entonces las partículas simplemente se pegarán al entramado y el sistema quedará atascado. En el extremo opuesto, si las fuerzas ópticas son mucho más pequeñas que la fuerza de Stokes entonces una partícula pasará a través del entramado óptico sin ser alterada. Ajustando entre los dos extremos de un entramado atascado y flujo libre, es posible obtener la deflexión de partículas que fluyen a través del entramado. Este régimen existe próximo al punto en el que ocurre el atascamiento, de modo que las partículas sean capaces de saltar entre unos máximos de intensidad de modo que queden guiadas diagonalmente a través del flujo. Debido a que existe este régimen a una velocidad de flujo/potencia de entramado diferente para partículas con diferentes capacidades de polarización, es posible obtener un guiado selectivo y de ahí la clasificación de las partículas. Para el guiado es importante considerar la diferencia en el potencial entre lugares de entramado adyacentes, es decir  $\Delta U$ , cuando la partícula se mueve a través del entramado óptico desde un máximo a un mínimo en la intensidad de luz. Con una altura de barrera más baja, el transporte entre lugares de entramado adyacentes se mejora debido a la barrera disminuida que proporciona una dirección de salida preferencial para una partícula a la máxima intensidad local.

55 Para mejorar la eficiencia de la separación, es deseable un elevado ángulo de deflexión. Para permitir esto, es importante algún grado de conectividad óptica entre nodos adyacentes del entramado. Con ello se quiere indicar que los pocillos de potencial no están separados en todas las direcciones por elevadas barreras. Para conseguir esto, se esculpe en consecuencia la distribución de la intensidad de luz. En esta forma, se pueden reducir fácilmente alturas de barrera a lo largo de una dirección con respecto a otra ajustando la intensidad relativa o la fase de los haces que forman el entramado.

60 La Figura 3 muestra varios mapas de intensidad en falso color y la línea de intensidad que escanea los entramados ópticos que tienen diferentes alturas de barrera entre máximos del entramado. En particular, la Figura 3(a) muestra un entramado en el que los máximos de la interferencia tienen igual intensidad en el orden cero y total en el primer orden, dando unos máximos de intensidad discretos, bien separados, casi completamente sin enlazar en ninguna

dirección. La Figura 3(b) muestra un mapa de intensidad y dos líneas de escaneado para la situación en la que se usa un filtro de densidad neutra de 3D en los haces de primer orden para introducir un enlace fuerte a lo largo de la dirección [100], mientras se mantiene un aislamiento fuerte a lo largo de la dirección [110]. Por ello, el entramado usado es asimétrico, esto es hay una conectividad más fuerte a lo largo de una diagonal que a lo largo de la diagonal opuesta. La Figura 3(c) muestra un mapa de intensidad y dos líneas de escaneado para la situación en la que se eliminan completamente dos haces de primer orden diagonalmente opuestos para producir un enlace completo a lo largo de la dirección [100] mientras, de nuevo, se mantiene el aislamiento a lo largo de la dirección [110]. Estos flecos existen también a lo largo del eje z [001], de modo que los máximos en línea, es decir barras de alta intensidad, caen en una formación de apilado, de modo que forman un entramado rectangular de vías ópticas extendidas. De nuevo, esto da como resultado un entramado asimétrico, pero en este caso, no hay enlace en una dirección y enlace completo en la otra, aunque este podría no ser el caso para todas las situaciones. En la práctica, se puede encontrar el rendimiento óptimo con el patrón mostrado en la Figura 3(b). Esto equilibra la necesidad de una fuerte interacción –que favorece entramados de trampas discretas (Figura 3a)– con la necesidad de una deflexión lateral fuerte (ángulo elevado) –que favorece un entramado de líneas extendidas de luz láser o perímetros de luz (Figura 3c)–.

Usando la disposición de la Figura 1, se pueden separar diferentes partículas de acuerdo con varios criterios físicos. Por ejemplo, partículas del mismo tamaño, pero diferentes capacidades de polarización (o, de modo equivalente, índices de refracción) pueden separarse mediante la selección de un entramado apropiado. La Figura 4 muestra esferas de polímero y sílice que fluyen conjuntamente de derecha a izquierda a través de un entramado óptico tetragonal centrado en el cuerpo. El tamaño de las esferas de sílice y polímero es el mismo, (y por ello su fuerza de Stokes es la misma), pero las fuerzas ópticas ejercidas sobre una esfera de polímero es mayor, debido a su capacidad de polarización relativa más alta. La velocidad del fluido fue de 30  $\mu\text{m/s}$ , con una potencia láser incidente total de 530 mW. En este ejemplo, el entramado óptico fue tal que había un enlace más fuerte entre los máximos de intensidad a lo largo de la dirección [100] que la de a lo largo de la dirección [010]. Este enlace impulsa a las partículas seleccionadas a seguir la dirección [100] en lugar de la dirección [010], dado que se requiere menos fuerza para mover una partícula entre picos de intensidad en la dirección [100].

La Figura 4(a) es una imagen de la mezcla sílice/polímero, indicando la densidad de partículas típica. En este ejemplo, el polímero tiene una densidad relativamente más baja que la sílice. Las diferencias por el contrario permiten que cada partícula sea seguida por separado usando velocimetría por imágenes de partículas. La Figura 4(b) muestra varias trayectorias para la mezcla de la Figura 4(a), indicando un círculo el intervalo xy sobre el que el entramado óptico es más intenso. A partir de esto se puede ver que las partículas que fluyen conjuntamente pueden separarse usando el entramado óptico. El rendimiento estimado del sistema fue de aproximadamente 25 partículas por segundo. Por razones de claridad, las trayectorias para polímero y sílice se muestran por separado en las Figuras 4(c) y 4(d) respectivamente.

A partir de la Figura 4(c), puede verse que los trazados del polímero muestran una deflexión de aproximadamente 45 grados. Esta separación angular muy grande puede atribuirse al enlace de los máximos de intensidad a lo largo de la dirección [100] del entramado óptico. En este caso, las esferas de polímero entran casi todas en el campo de visión solamente una vez que alcanzan la parte más intensa del entramado óptico. La menor densidad de esferas de polímero significa que normalmente fluyen separándose de la superficie inferior de la celda de muestras, pero son guiadas posteriormente al interior del plano focal de la óptica de supervisión por las fuerzas ópticas. Una vez en el plano focal, todas las esferas de polímero se mueven a lo largo de la dirección [100], y ninguna a lo largo de la [010]. Esto es debido a una asimetría introducida entre las direcciones  $\langle 100 \rangle$  del entramado óptico subyacente. Por el contrario, como se muestra en la Figura 4(d) los trazados de la sílice son solo ligeramente modulados por el entramado óptico. En este caso, las esferas de sílice entran todas en el campo de visión en el borde derecho y se mueven aproximadamente en líneas rectas, excepto en la parte mitad izquierda del campo de visión, en donde son desviadas de modo oscilante (ligeramente) por la parte más intensa del entramado, sin dar como resultado una deflexión neta. Por ello, se puede ver que las esferas de sílice y polímero pueden separarse, debido a las diferencias en las capacidades de polarización de los dos materiales, lo que hace que las esferas interactúen con el entramado de formas diferentes.

La Figura 4(e) indica que el rendimiento puede incrementarse sin coste para la eficiencia mediante el incremento de la potencia láser (y por ello el  $\Delta U$ ) según se incrementa la velocidad del flujo. Para cualquier potencia de láser dada, cuando la velocidad de flujo de partículas se incrementa o la potencia láser se disminuye o se cambia el tamaño de partículas o la capacidad de polarización relativa, se observa un cambio desde un comportamiento fuertemente capturado a saltos para el flujo guiado. Esto se puede ajustar adicionalmente usando pseudo-balística para regímenes guiados de modo difusivo, y – finalmente – al límite en el que todas las partículas fluyen pasando sin ser alteradas. Da como resultado una dispersión en las deflexiones angulares (fraccionamiento) para cualquier suspensión que contenga una amplia distribución de tamaños. Adicionalmente, cuando las interacciones partícula-partícula se hacen significativas (o bien como una función de la longitud de malla o bien de la densidad), la transición de desanclaje puede aceptar un carácter colectivo, de muchos cuerpos. A velocidades justamente más allá del desanclaje, ambas especies son desviadas por el entramado óptico. Al seleccionar apropiadamente las velocidades de partícula/ potencia láser se puede conseguir la separación óptima.

Para comparar los efectos del uso de diferentes tipos de entramado, se realizaron varios experimentos. En cada caso se fraccionó un flujo mezclado de esferas de sílice de 2 micras y polímero de 2 micras debido a sus diferentes índices de refracción. La potencia láser total en el entramado se mantuvo la misma entre experimentos en ángulos iguales (2 W a 45 grados y 0,75 W a 10 grados) tal como lo fueron todos los otros parámetros. Los resultados se muestran en la Figura 5. A partir de ésta, se ve claramente que para la clasificación a 45 grados el rendimiento óptimo llega a través del uso del entramado enlazado de la Figura 3(b), que es un entramado tetragonal centrado en el cuerpo (BCT). A 10 grados, en donde los lugares de entramado discretos tenían capacidad de deflexión de partículas, las guías extendidas dieron la velocidad de flujo más alta, pero el entramado BCT tiene una tasa de error inferior sin que sean desviadas partículas de la especie B por encima de 10 micras/segundo. Es destacable que en una situación en la que las deflexiones de ángulos grandes no son críticas es posible funcionar con potencias láser mucho menores para la misma velocidad de flujo. Sin embargo el uso de dichos ángulos inferiores requiere entramados más grandes e incrementa la probabilidad de efectos de muchos cuerpos que reducen el rendimiento del sistema. En el caso de trampas discretas, se descubrió que este entramado es incapaz de fraccionamiento a 45 grados, representado como una velocidad óptima de 0 micras/segundo y que esto es menos efectivo comparado con los otros entramados con menores ángulos de deflexión. Todos estos resultados se obtuvieron a partir de experimentos cuantitativos del tipo mostrado en la Figura 4.

Las partículas se pueden separar también de acuerdo con el tamaño. La separación de acuerdo con el tamaño se ha demostrado también experimentalmente usando tanto esferas de sílice como partículas de bajo índice. En la Figura 6 las cruces negras 32 representan posiciones de dos microcápsulas de proteína de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro cuando fluyen de derecha a izquierda a través del entramado óptico. De nuevo, se consigue una deflexión angular significativa, mientras una cápsula de la misma clase de 4  $\mu\text{m}$  de diámetro fluyendo conjuntamente fluye casi recta a todo lo largo, tal como se muestra por los puntos 34. En este caso, la velocidad de flujo fue de 20  $\mu\text{m/s}$  con una potencia incidente total de 530 mW. Esto permite la creación de una colección monodispersa de microcápsulas de proteína. Estas microcápsulas de proteína son un agente de contraste por ultrasonidos que se puede usar para permear localmente membranas celulares. Esto es de interés para una transfección directa de ADN o suministro de fármacos, una técnica conocida como sonoporación. La capacidad para crear una colección monodispersa de estas microcápsulas de proteína ofrece un control ampliamente mejorado y una comprensión de los procesos implicados en la sonoporación. Destacablemente, se ha demostrado el fraccionamiento óptico en este caso para partículas con un índice de refracción más bajo que el medio que las rodea. Sin embargo, como se apreciará, aunque el mecanismo físico para la separación es análogo para aquellas partículas de índice elevado, las partículas de índice bajo son repelidas por, en lugar de atraídas a, las zonas de alta intensidad de luz.

Allí donde haya una diferenciación insuficiente entre las capacidades de polarización de especies de partículas dentro de un flujo mezclado o en donde una especie de partícula es demasiado pequeña para conseguir una atracción no resonante al entramado óptico (por ejemplo proteínas), se puede usar la clasificación con marcado. En este enfoque, se usan partículas de ayuda marcadas tal como estreptavidina o microesferas recubiertas de anticuerpo para seleccionar unas especies de partícula específicas que puedan entonces separarse usando un entramado óptico. La Figura 7 muestra una representación en diagrama de esta técnica usando cromosomas.

La metodología en la que se realiza la invención es particularmente útil para la clasificación de células y ADN. Éstas pueden clasificarse de la misma manera que otras partículas, es decir: por sus propiedades físicas tal como tamaño, forma o índice de refracción. La clasificación de eritrocitos frente a linfocitos se muestra en la Figura 8. Ésta muestra un único eritrocito que es guiado selectivamente a través del entramado óptico cuando el resto de células en el flujo (linfocitos) pasan directas a lo largo sin ser alteradas. La separación de macromoléculas tal como ADN y proteínas puede tener lugar directamente en el entramado, por medio del uso de esferas marcadas como se ha destacado anteriormente o donde dichas marcas no existen el uso de una de las técnicas descritas a continuación (E).

La presente invención proporciona muchas características técnicas ventajosas. Una característica clave de la metodología es su naturaleza no invasiva y la capacidad que la acompaña para clasificar partículas sin ningún contacto físico con el sistema en absoluto. El método es reconfigurable de modo que sus criterios de selección pueden ajustarse en tiempo real. Adicionalmente, el único uso de fuerzas ópticas simplifica la interacción superficial y los problemas de esterilidad eliminando el área superficial extremadamente alta asociada con cualquier tamiz o gel físico. La eficiencia puede aproximarse al 100%, siendo observados valores del 96% o más incluso en el límite superior del régimen semi-diluido. Esto se puede conseguir sin necesidad de exponer los analitos a una alta carga eléctrica, y mientras evita la introducción de superficies de material adicional tal como se asociaría con tamices micro-fabricados. Esto simplifica los requisitos litográficos de celdas de muestra. Adicionalmente, la invención no requiere el uso de micro-restricciones no fiables, reduciendo de ese modo la probabilidad de atascos o bloqueos. Otra ventaja adicional más es que mediante el uso de un entramado óptico, puede evitarse la necesidad de partículas marcadas que han de ser separadas, aunque tal como se ha descrito previamente, se puede usar el marcado cómo y cuándo se desee para una funcionalidad adicional. También, no hay necesidad de que las partículas tengan diferentes fluorescencias. Además, a diferencia de otros métodos existentes, el método en el que se realiza la invención permite la separación de partículas que tengan tamaños que difieran en menos del 20%. Esto incrementa la practicidad de la técnica, permitiendo que se use para muchas aplicaciones diferentes. Adicionalmente, la técnica puede integrarse en microscopios existentes o usarse como un dispositivo independiente. También está idealmente adaptada a la integración en otras técnicas de clasificación basadas en micro-flujos para

dar propiedades de clasificación complementarias o ser incorporadas en un sistema de análisis micro total mayor.

5 Un experto en la materia apreciará que son posibles variaciones de las disposiciones desveladas sin apartarse de la invención. Por ejemplo, para especies débilmente segregadas, el analito puede o bien recircularse a través del entramado óptico o bien dirigirse a través de cámaras de separación en cascada. Una ventaja de esta última opción es que permite el empleo de múltiples criterios de selección en un único chip integrado. También, mientras la descripción se ha concentrado en la clasificación por tamaño o tipo de partículas, es posible usar la invención para clasificar partículas de acuerdo con su forma. Esto es debido a que partículas de formas diferentes interactuarán más o menos intensamente con el entramado óptico de modo que las partículas puedan clasificarse también por la forma. Un ejemplo es que un objeto cilíndrico interactuará más completamente (debido a su alineación con el entramado) con un entramado de guías extendidas que una partícula esférica haciendo por ello posible clasificar partículas cilíndricas respecto a partículas esféricas.

15 Adicionalmente, el uso de entramados ópticos puede generalizarse al caso de un panorama óptico (un patrón óptico tanto en 2D como en 3D con o sin simetría rotacional o de espejo). En este caso no es siempre necesario tener un flujo a través del entramado sino que de hecho el patrón (incluyendo el entramado óptico) puede escanearse dinámicamente de modo que el movimiento selectivo de partículas sea proporcionado por el movimiento del entramado (movimiento y escaneando en este caso significa no el movimiento del patrón completo sino más bien el movimiento de las características del patrón de modo que una partícula siga por ejemplo unos máximos de luz que se mueven a través del área del patrón). En este escenario, cuando se mueve el panorama en sí, el movimiento de una partícula depende críticamente de la velocidad relativa del panorama respecto al tiempo de Kramer, es decir cuánto tiempo permanecerá la partícula en un máximo de intensidad local y si este tiempo es o no más corto que el tiempo de ese máximo a través de la partícula. Es posible también combinar las dos técnicas juntas de modo que el entramado dinámico añada funcionalidad al entramado estático para la clasificación de partículas que fluyen a través del entramado óptico. En consecuencia, la descripción anterior de la realización específica se realiza a modo de ejemplo solamente y no con la finalidad de limitación. Estará claro para el experto en la materia que se pueden realizar modificaciones menores sin cambios significativos a la operación descrita.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Sistema de fraccionamiento para la separación de partículas que tengan diferentes características físicas, por ejemplo diferentes tamaños o índices de refracción, siendo proporcionadas las partículas en un fluido, comprendiendo el sistema:
- 10 medios para la formación de un entramado óptico asimétrico que tenga una pluralidad de pocillos de potencial, estando enlazados dichos pocillos de potencial en una dirección del entramado y estando sustancialmente sin enlazar en otra dirección del entramado, estando definidos los pocillos de potencial por que tienen alturas de barrera sustancialmente reducidas en dicha una dirección con respecto a dicha otra dirección; y
- 15 medios para provocar que el fluido que contiene las partículas fluya a través del entramado a una velocidad de flujo que permita que las fuerzas generadas por el entramado óptico provoquen la deflexión de las partículas a lo largo de los pocillos de potencial enlazados en función de una característica de las partículas, tal como tamaño o índice de refracción.
- 20 2. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente una cámara de fraccionamiento en la que se define el entramado óptico.
3. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 2 que comprende una o más cámaras de captura para la captura de las partículas separadas en la cámara de fraccionamiento.
- 25 4. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que sea operativo para escanear el entramado óptico.
5. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el entramado es tridimensional.
- 30 6. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se proporcionan en serie dos o más entramados ópticos.
7. Un método para la optimización de la clasificación de partículas en un flujo de fluido que comprende:
- 35 la formación de un entramado óptico asimétrico que tenga una pluralidad de pocillos de potencial, estando enlazados dichos pocillos de potencial en una dirección del entramado y estando sustancialmente sin enlazar en otra dirección del entramado, estando definidos los pocillos de potencial enlazados mediante alturas de barrera sustancialmente reducidas en dicha una dirección con respecto a dicha otra dirección;
- 40 el ajuste del entramado óptico, y/o la variación de la velocidad del flujo de partículas a través del entramado hasta que se alcancen las condiciones óptimas, para permitir de ese modo la deflexión de las partículas a lo largo de los pocillos de potencial enlazados en función de una característica de las partículas, tal como el tamaño o el índice de refracción.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la etapa de ajuste implica la variación de un enlazado entre pocillos de potencial adyacentes en el entramado.
- 45 9. Un método para la clasificación de partículas en un flujo de fluido que comprende:
- 50 la formación de un entramado óptico asimétrico que tenga una pluralidad de pocillos de potencial, estando enlazados dichos pocillos de potencial en una dirección del entramado y estando sustancialmente sin enlazar en otra dirección del entramado, estando definidos los pocillos de potencial enlazados mediante alturas de barrera sustancialmente reducidas en dicha una dirección con respecto a dicha otra dirección; y
- hacer que el fluido que contiene las partículas fluya a través del entramado, en donde las fuerzas generadas por el entramado óptico provoca la separación de las partículas mediante la deflexión de las partículas a lo largo de los pocillos de potencial enlazados en función de una característica de las partículas, tal como el tamaño o el índice de refracción.



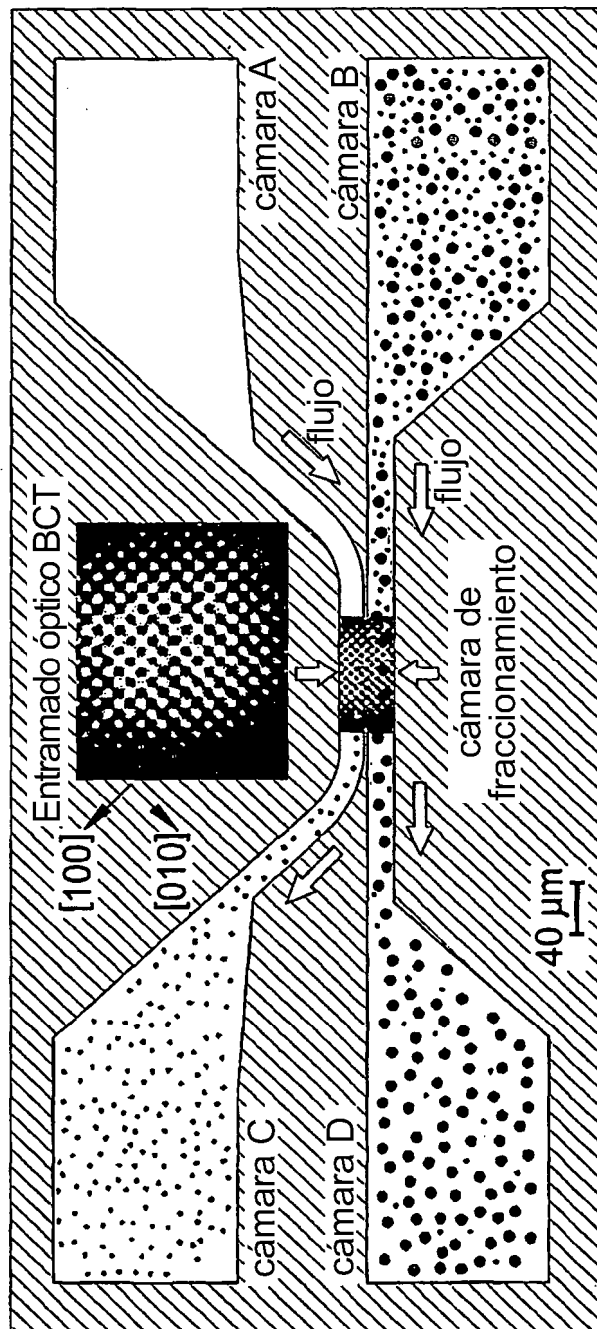


Fig.1



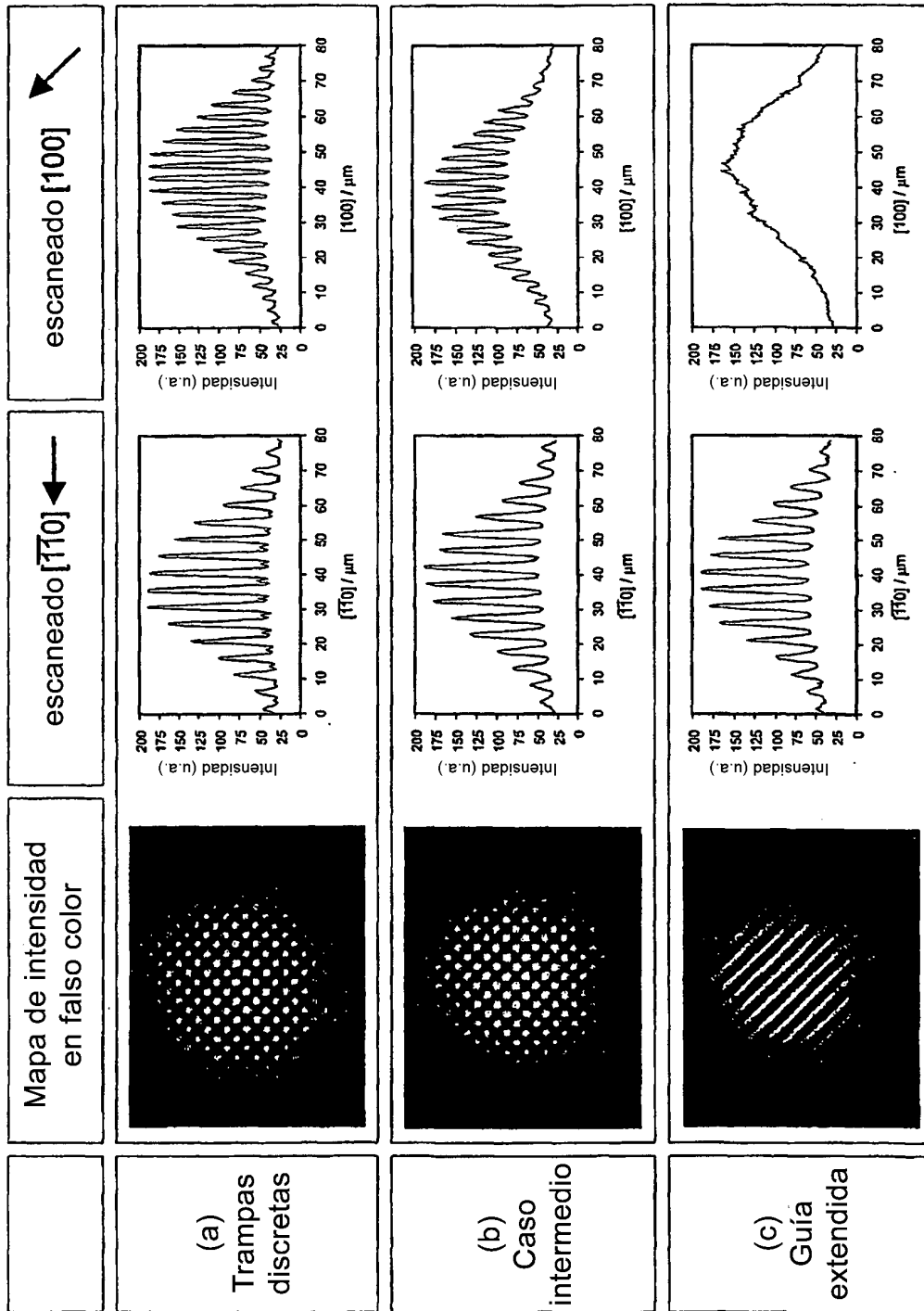


Fig.3

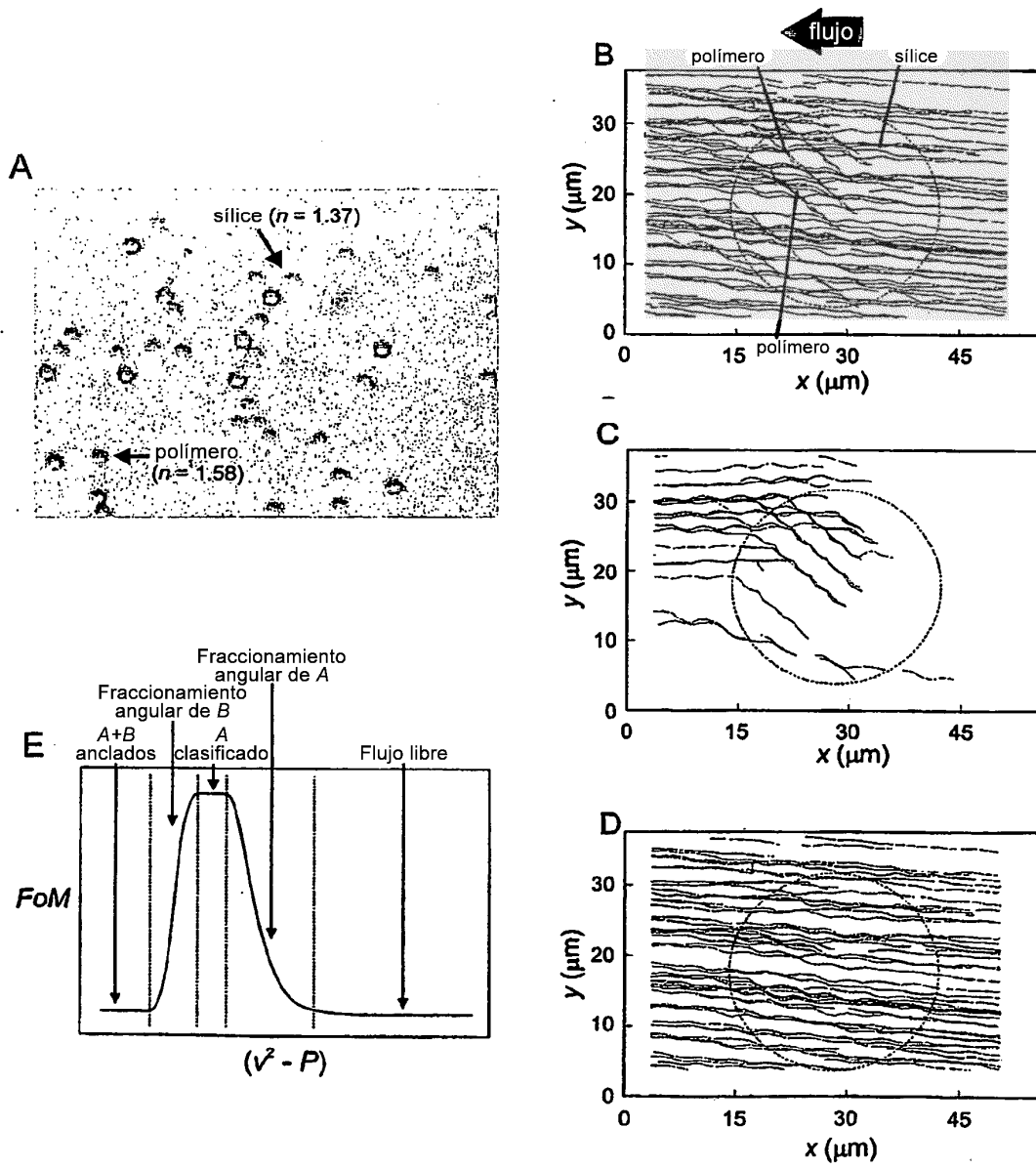


Fig.4

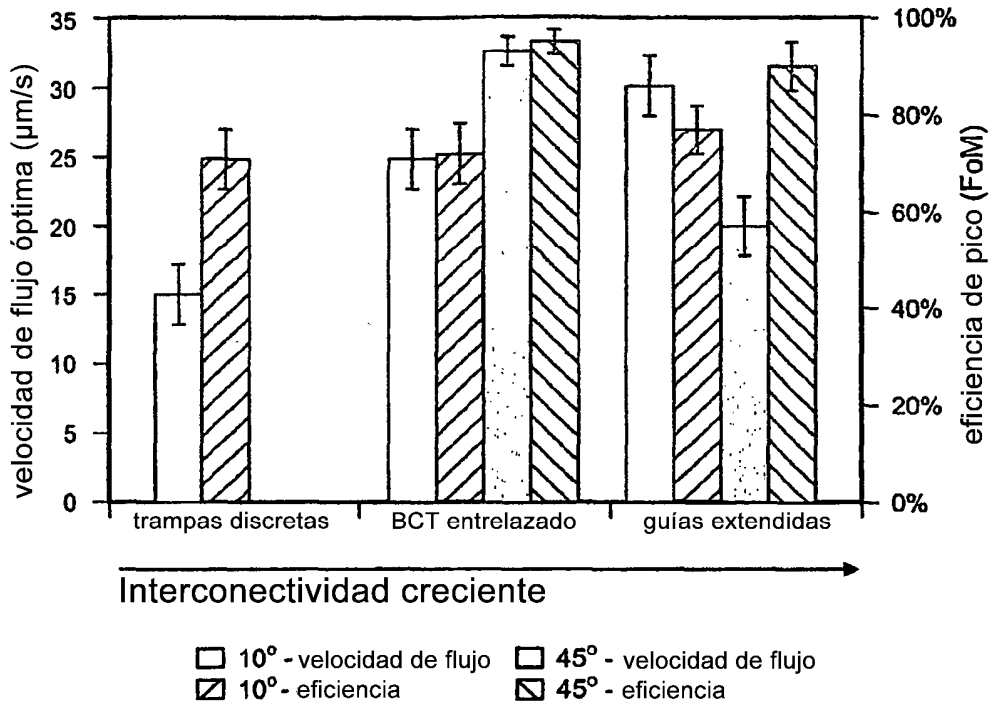


Fig.5

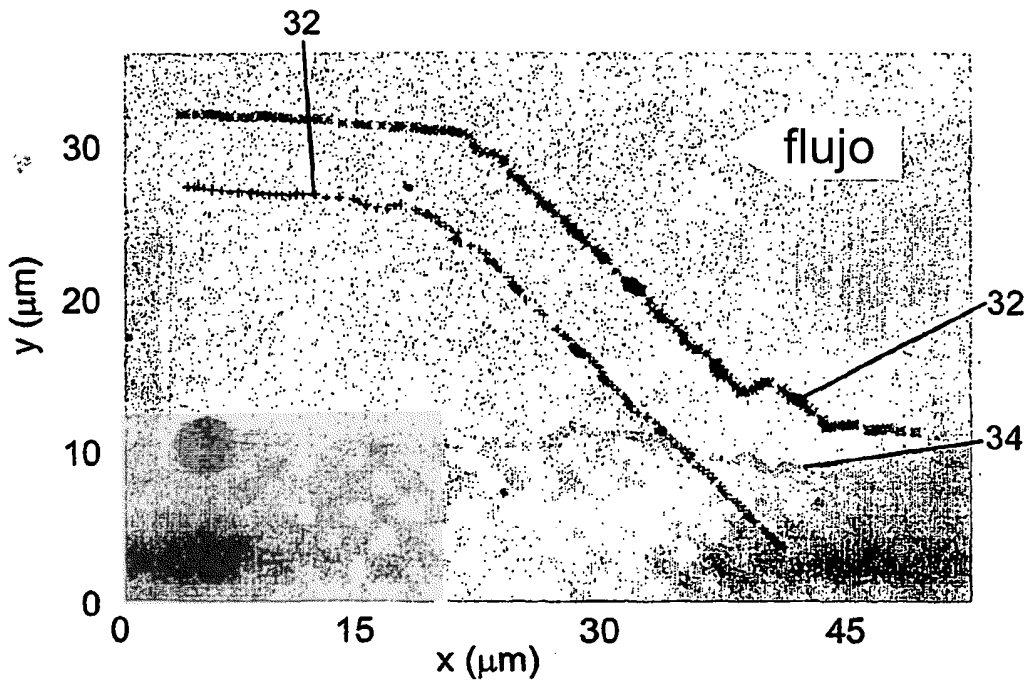


Fig.6

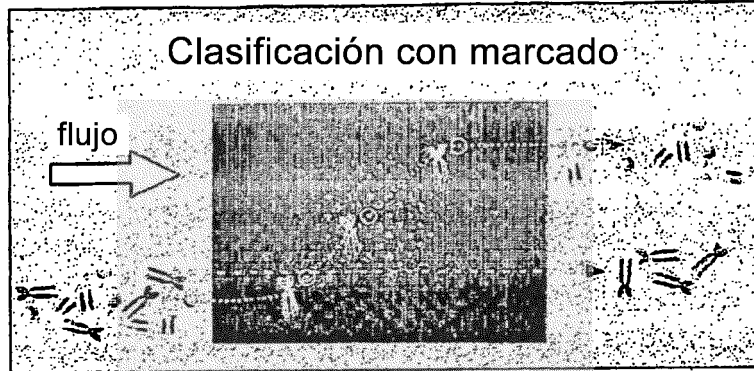
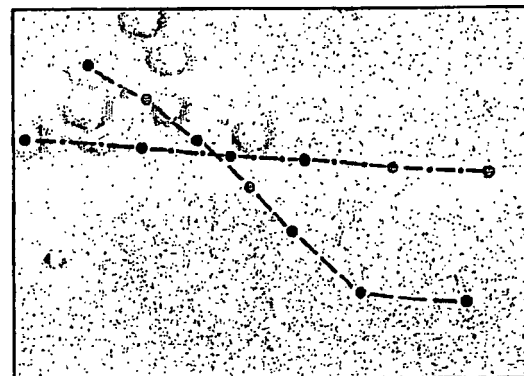
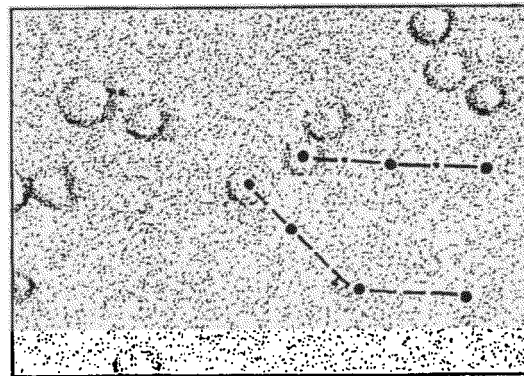
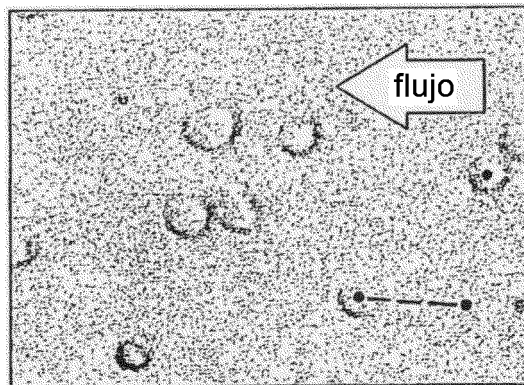


Fig.7



--- linfocitos de ejemplo  
--- eritrocito único

Fig.8